



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ESTUDOS DO CROMO TRIVALENTE SOBRE OS ASPECTOS FISIOLÓGICOS, ANATÔMICOS E GENÉTICOS EM PLANTAS

NATALIA NATI

Vitória, Espírito Santo

2011

NATALIA NATI

ESTUDOS DO CROMO TRIVALENTE SOBRE OS ASPECTOS FISIOLÓGICOS, ANATÔMICOS E GENÉTICOS EM PLANTAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal do Centro de
Ciências Humanas e Naturais da
Universidade Federal do Espírito
Santo, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Biologia Vegetal.

Orientador: Dr^a. Silvia Tamie Matsumoto

Co-orientador: Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol

VITÓRIA – ESPÍRITO SANTO
FEVEREIRO – 2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

N277e Nati, Natália, 1986-
Estudos do cromo trivalente sobre os aspectos fisiológicos,
anatômicos e genéticos em plantas / Natália Nati. – 2011.
97 f. : il.

Orientadora: Silvia Tamie Matsumoto.
Co-Orientador: Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Cebola. 2. Fisiologia. 3. Anatomia. 4. Citologia. 5. Cromo.
6. Inga vera. I. Matsumoto, Silvia Tamie. II. Cuzzuol, Geraldo
Rogério Faustini. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

Dedico esse trabalho aos meus pais, Darcirene e José, que tanto lutaram e se sacrificaram por mim e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* por ter me dado saúde, perseverança e a oportunidade de conhecer a todos que agradecerei afinal ninguém consegue algo sozinho.

À Universidade Federal do Espírito Santo, pelo ensino e infra-estrutura disponibilizados na minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo – FAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À prof.^a Dr.^a *Silvia Tamie Matsumoto*, por ter me dado a oportunidade de aprender a ser profissional, e por ter me ensinado com disposição e paciência.

Ao prof.^o Dr.^o *Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol* por sua ajuda e por disponibilizar seu laboratório e seus equipamentos para a realização desse trabalho.

À prof.^a Dr.^a *Camilla Rozindo Dias Milanez*, por seu auxílio em todas as análises anatômicas, pela disposição em nos ajudar mesmo quando já estava tarde da noite, pelos cursos ofertados em seu laboratório e por aceitar ser da banca examinadora.

À prof.^a Dr.^a *Maria Aparecida Marin-Morales* pela ajuda na interpretação dos dados de mutagênese.

À Dr.^a *Thais Cristina Casimiro Fernandes* por sua disponibilidade e prontidão em aceitar ser membro da banca examinadora.

Às professoras Dr.^a *Flávia Imbroisi Valle Errera* e Dr.^a *Patrícia Maria Oliveira Pierre* também por aceitarem serem membros da banca examinadora.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pelos conhecimentos transmitidos a nós e pelo auxílio nas etapas do curso.

Aos meus pais, *Darcirene* e *José*, pelo amor incondicional, pelo apoio na realização desse trabalho e em outras muitas ocasiões.

À minha irmã, *Tássia*, por me ouvir com paciência e por me ajudar nas medidas de crescimento, na preparação das lâminas anatômicas e em muitas outras etapas desse trabalho.

Ao meu irmão, *Charles*, por dividir com meus pais a tarefa de cuidar de mim e Tássia.

Ao meu amor e amigo, *Wallace*, por me amparar em todas as situações, por ir comigo à Sooretama buscar as mudas de ingá e também por me acompanhar à casa de vegetação todos os sábados para aplicação do cromo.

À minha tia *Viviane*, simplesmente por tudo que fez por mim e por minha família.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, aos que já foram e aos que ainda estão. À *Mariana*, companheira de análise nas férias, por sua amizade e ajuda no transplante das mudas, nas medidas de crescimento e na extração de pigmentos. À *Lívia* por sua amizade, por trazer alegria ao laboratório e por ter me ajudado nas medidas de crescimento. Ao *Ian*, único representante masculino no laboratório, por ter sofrido com os nossos “chiliques” e por ter me ajudado no transplante das mudas. À *Stephani* e *Marina* pela disposição e amizade. Ao *Levi* companheiro de mestrado e laboratório pelas palavras de ânimo e por seu entusiasmo.

Aos companheiros de mestrado que se tornaram amigos pela ajuda e companheirismo. À *Jessica*, amiga de todas as horas, pela ajuda nas análises de crescimento e companhia na casa de vegetação. À *Raiany* pela amizade sincera e ajuda nas coletas de material para anatomia e no preparo das lâminas. À *Hiulana* pelo seu ombro amigo e ajuda na anatomia. À *Magda* por ser doce e solícita e pela ajuda na extração e quantificação de pigmentos. Ao *Diego* pelas risadas e ajuda na coleta e transporte das amostras para análises químicas. À *Inayá* pela amizade, carinho e pela ajuda na casa de vegetação. Ao *Stéfano* pela companhia, ajuda e por sua alegria. À *Larissa*, *Priscilla* e *Anny* pelo consolo, conforto e palavras amigas. Ao *Adriano* e *Marcos Thiago* pela amizade, companhia nos almoços, ajuda nos cronogramas e na extração de pigmentos.

Ao *Ricardo*, secretário do Programa de Pós-Graduação, por estar sempre disposto a nos ajudar e não medir esforços para isso.

À *Beth*, pela amizade e carinho, por suas histórias e por trazer alegria ao prédio da Botânica.

Aos meus amigos de turma de Ciências Biológicas, *2005/1*, pelas várias histórias e gargalhadas.

Às minhas amigas *Anazélia, Paula e Cristiane* pelo apoio e amizade incondicionais.

A todos meus *amigos* que contribuíram para que eu me tornasse o que sou hoje.

A todos meus *professores* da Educação Infantil, Ensino Fundamental, Ensino Médio, e do curso de Ciências Biológicas a minha gratidão pela perseverança e vontade de ensinar.

RESUMO

A contaminação ambiental por metais pesados é uma preocupação mundial, uma vez que, a principal fonte desses poluentes são os efluentes industriais e domésticos. O cromo é um dos metais pesados mais abundantemente encontrados nos recursos hídricos do Espírito Santo em função de uma diversidade de atividades industriais. Nesse contexto, foram avaliados os efeitos de concentrações decrescentes de cromo trivalente na anatomia e na fisiologia em plantas jovens de *Inga vera* e seu efeito sobre as células no aspecto da toxicidade e mutagenicidade em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. Raízes de bulbos de *A. cepa* L. (Liliaceae) foram mantidas em soluções de cromo trivalente em diferentes concentrações, 0,5000 mg/L; 0,0500 mg/L; 0,0250 mg/L; 0,0125 mg/L; 0,0062 mg/L e 0,00 mg/L por 24, 48 e 72 horas para as avaliações de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Para as plantas de *Inga vera* Willd. (Fabaceae) as mudas foram expostas ao poluente nas concentrações de 0,5000 mg/L; 0,0500 mg/L; 0,0250 mg/L; 0,0125 mg/L e 0,00 mg/L, por 60 e 120 dias. As raízes e folhas foram coletadas para as avaliações fisiológicas, onde foram mensurados o crescimento e biomassa. Nas folhas também foram realizadas mediadas de pigmentos fotossintetizantes. Foram realizados cortes anatômicos dos diferentes órgãos das plantas para comparar os espécimes expostos ao cromo aos que cresceram na ausência desse poluente. As informações obtidas nesse estudo deverão alertar os órgãos de fiscalização ambiental sobre o impacto gerado pelo cromo trivalente, potencial poluidor de efluentes, visando à prevenção da saúde pública, uma vez que há a possibilidade do consumo de animais aquáticos e produtos agrícolas contaminados. Em relação aos índices de citotoxicidade foi possível notar, que as maiores concentrações apresentaram queda na divisão celular conforme o tempo de exposição aumenta. As concentrações mais altas testadas mostraram alto potencial genotóxico, no entanto com o aumento do tempo de exposição essa situação foi normalizada. Para mutagenicidade observaram-se médias estatisticamente superiores proporcionais às concentrações do metal cromo. Esses dados indicam um efeito agudo de genotoxicidade e mutagenicidade causado por esse metal em *A. cepa*. Os dados de análises de crescimento, em plantas de *Inga vera*, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Na análise de pigmentos fotossintetizantes foi possível observar que os indivíduos expostos a diferentes concentrações apresentaram teores de pigmentos semelhantes. Folhas e raízes de plantas expostas e não expostas ao cromo não mostraram alterações em suas organizações. Os resultados obtidos indicam que *I. vera* é uma espécie resistente às concentrações de cromo analisadas nas condições desse experimento.

Palavras-chave: *Allium cepa*, anatomia, citologia, cromo trivalente, fisiologia, *Inga vera*.

ABSTRACT

Environmental contamination by heavy metals is a global concern, since the main source of these pollutants are industrial and domestic effluents. Chromium is a heavy metal found more abundantly in the water resources of the Holy Spirit according to a diversity of industrial activities. In this context, we evaluated the effects of decreasing concentrations of trivalent chromium in anatomy and physiology in seedlings of *Inga vera* Willd. (Fabaceae) and its effect on cells in the aspect of toxicity and mutagenicity in meristematic cells of *Allium cepa* L. (Liliaceae) roots. Roots from bulbs of *A. cepa* were kept in solutions of trivalent chromium at different concentrations, 0.5000 mg / L, 0.0500 mg / L, 0.0250 mg / L, 0.0125 mg / L, 0.0062 mg / L and 0, 00 mg / L for 24, 48 and 72 hours for evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity. Plants at *Inga vera* seedlings were exposed to pollutant concentrations of 0.5000 mg / L, 0.0500 mg / L, 0.0250 mg / L, 0.0125 mg / L and 0.00 mg / L for 60 and 120 days. The roots and leaves were collected for physiological evaluations, where we measured the growth and biomass. In leaves were also mediated photosynthetic pigments. Cuts were made with the different anatomical parts of plants to compare the specimens exposed to chromium for those who grew up in the absence of such pollutant. Information obtained in this study should alert environmental inspection agencies on the impact generated by trivalent chromium, pollution potential of effluents, for the prevention of public health, since there is the possibility of consumption of aquatic animals and contaminated agricultural products. Compared to the cytotoxicity was possible to note that the highest concentrations in cell division decreased as exposure time increases. The highest concentrations tested showed high genotoxic potential, however with increasing exposure time the situation was normalized. For mutagenicity observed statistically higher proportional to the concentration of the metal chromium. These data indicate an acute effect on genotoxicity and mutagenicity caused by this metal in *A. cepa*. The data analysis of growth in plants of *Inga vera*, showed no significant difference between treatments. In the analysis of photosynthetic pigments was observed that individuals exposed to different concentrations showed similar levels of pigments. Leaves and roots of plants and are not exposed to chromium showed no change in their organizations. The results indicate that *I. vera* is a species resistant to the concentrations of chromium analyzed under the conditions of this experiment.

Keywords: *Allium cepa*, anatomy, cytology, *Inga vera*, physiology, trivalent chromium.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 2:

Figura 1 – Gráfico de alocação de biomassa em folhas, caule e raiz de plantas jovens de *I. vera* submetidas a diferentes concentrações de cromo trivalente. A = gráfico correspondente à análise de tempo zero. B = gráfico correspondente à análise de 60 dias. C = gráfico correspondente à análise de 120 dias.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1:

Tabela 1 – Médias dos índices mitótico, genotóxico e mutagênico das seis amostras de *A. cepa* submetida a diferentes concentrações de cromo, C1; C2; C3; C4; C5 e C6 em três diferentes tempos de exposição, 24, 48 e 72 horas. 47

Tabela 2 – Frequência (%) de micronúcleos (MN), pontes, C-metáfase (C-met), aderências (Ad), perdas, quebras, anáfases multipolares (AM), fragmentações nucleares (Frag), brotos nucleares (Brot) e células binucleadas (CBN) encontradas em células meristemáticas de *A. cepa* nos tratamentos, C1, C2, C3, C4, C5 E C6 nos três diferentes tempos de exposição, 24, 48 e 72 horas. 51

Artigo 2:

Tabela 1 – Médias da altura; área foliar; número de folhas; razão área foliar por número de folhas (A:F); razão raiz parte aérea (Raiz:PA); massa fresca específica (MFE); área foliar específica (AFE); taxa assimilatória líquida (TAL); razão de área foliar (RAF); taxa de crescimento relativo (TCR), em plantas jovens de *I. vera*, submetidas a diferentes concentrações de cromo trivalente. 64

Tabela 2 – Médias das concentrações de clorofila a; clorofila b; razão clorofila a clorofila b (Clor a/Clor b); clorofila total e carotenóides em mg. g MS⁻¹, em plantas jovens de *I. vera*, submetidas a diferentes concentrações de cromo trivalente. 67

Tabela 3 – Médias de densidade estomática (número de estômatos por mm²), em plantas jovens de *I. vera* cultivadas em casa de vegetação expostas a diferentes concentrações de cromo trivalente. 68

Tabela 4 – Médias, em micrômetros, das espessuras da epiderme adaxial, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, epiderme adaxial e limbo, em plantas jovens de *I. vera*, submetidas a diferentes concentrações de cromo trivalente. 69

Tabela 5 – Médias, em micrômetros das espessuras, da epiderme, cilindro vascular, córtex, e diâmetro total da raiz em plantas jovens de *I. vera*, submetidas a diferentes concentrações de cromo trivalente. 70

Tabela 6 – Análises químicas de folhas e raízes de plantas jovens de *I. vera*, submetidas a diferentes concentrações de cromo trivalente e no solo do experimento, no tempo zero, 60 dias e 120 dias. 73

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1.INTRODUÇÃO.....	14
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Contaminações ambientais por metais pesados.....	15
2.2 O metal cromo.....	17
2.3 Características da espécie <i>Inga vera</i>	19
2.4 Espécie <i>Allium cepa</i> como organismo teste.....	21
2.5 Importância de análises fisiológicas e anatômicas em plantas impactadas.....	22
3. HIPÓTESES.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo Geral.....	24
4.2 Objetivos Específicos.....	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.1 Desenho Experimental.....	25
5.2 Análise de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade.....	26
5.3 Análises de Crescimento.....	28
5.4 Análises Anatômicas.....	28
5.4.1 Análises Anatômicas Quantitativas.....	29
5.4.2 Análises Histoquímicas.....	29
5.5 Determinação do Teor de Pigmentos.....	29
5.6 Quantificação de Macronutrientes, Micronutrientes e Teor de Cromo.....	30
5.7 Análises Estatísticas.....	30
6. REFERÊNCIAS.....	31
7. RESULTADOS.....	39
Artigo 1: Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do cromo trivalente, pelo ensaio <i>Allium cepa</i>	39
Artigo 2: Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de <i>Inga vera</i> Willd. (Fabaceae: Mimosoideae) expostas a diferentes concentrações de cromo trivalente.....	57
8. CONCLUSÕES.....	80
9. ANEXOS.....	81